

09/403092

REC'D	22 JUN 1998
WIPO	PCT

PRIORITY DOCUMENT



Bescheinigung

Die Hoechst Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalls und zur Vakzinierung"

am 15. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 07 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. Dezember 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Kel

Aktenzeichen: 197 15 586.3

Beschreibung

Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalls und zur Vakzinierung.

Die Erfindung betrifft ein Antigen aus den adulten Stadien des Lungenwurms

Dictyocaulus viviparus (im folgenden auch D. viviparus oder Dictyocaulus genannt) des Rindes, mit dem man immundiagnostisch Lungenwurmbefall bei Rindern nachweisen kann. In einer Vakzine kann das Antigen Immunschutz gegen D. viviparus hervorrufen.

Lungenwürmer haben insbesondere bei kleinen und großen Wiederkäuern eine große pathogene und wirtschaftliche Bedeutung. Dictyocaulus ist der einzige beim Rind Geschlechtsreife erlangende Lungenwurm. Er kommt weltweit dort vor, wo zumindest zeitweise gemäßigte Temperaturen von 15-20°C herrschen. Endemisch ist D. viviparus in Europa in den großen Flüssen, regenreichen Küstengebieten aber auch auf alpinen Almen verbreitet (R. J. Jörgensen (1980) Vet. Parasitol. 7, 153-167; H. Pfeiffer (1976) Wien. Tierärztl. Mschr. 63, 54-55). In den Niederlanden wurde z. B. bei über 77 % der auf Weiden gehaltenen Kälbergruppen klinische Dictyokaulose festgestellt (J. Boch, R. Supperer (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie. 4. Aufl., Parey, Berlin, S. 294-301).

Die Aufnahme der dritten Larven mit dem Weidegras verursacht beim erstmals exponierten Kalb die Erkrankung (Dictyokaulose). Die Larven erreichen auf dem Blutweg die Alveolen der Lungen, die sie durchbrechen, um in die luftführenden Teile der Lunge zu gelangen. Dabei werden Läsionen erzeugt, die als Eintrittspforte für bakterielle Sekundärinfektionen dienen; die Vermehrung von Bakterien und anderer mikrobieller Erreger führt zu begrenzten oder generalisierten Lungenentzündungen mit allen möglichen Folgeerscheinungen wie Lungenödem und Herzversagen (T. Schnieder, A. Bellmer, F.-J. Kaup (1989) Wien. Tierärztl.

Msch. 76, 437-476). Die Almung wird, auch durch die in den oberen

Almungswegen zu Obstruktionen führenden adulten Stadien, erheblich erschwert. Sichtbare Folgen der starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens sind

verminderte Gewichtszunahmen oder gar Gewichtsverluste verbunden mit Wachstumsverzögerungen. Bisweilen verschlimmern sich die klinischen Symptome dramatisch und führen rasch zum Tod.

Die Lungenwurmerkrankung der Rinder kann anhand der klinischen Symptomatik (G. Gräfer (1987) Monatsh. Vet. med. 42: 178-181) oder anhand der mit dem Kot ausgeschiedenen Larven diagnostiziert werden (J. Boch, R. Supperer (1992). Diese Möglichkeiten eignen sich vor allem für die Diagnose am Einzeltier, wenn eine starke Infektion vorliegt. Zu der modernen Massentierhaltung werden jedoch, basierend auf einer geeigneten Diagnostik, epidemiologische Voraussagen und Risiko einschätzungen bezüglich des Ausbruchs einer Dictyokaulose in der fortgeschrittenen Weidesaison benötigt; d. h. in Surveys müssen viele, möglicherweise noch schwach infizierte Kälber mit einer sicheren, sensiblen Methode untersucht werden. Hierzu sind serologische Methoden geeignet (A. Bellmer, T. Schnieder, A. M. Tenter (1989) Proc. 13th Conf. Wld Ass. Adv. Vet. Parasit., S. 33, Berlin, 07.-11.08.1989). In Dictyocaulus viviparus identifizierte, isoliert und teilweise rekombinant dargestellte Antigene werden zur Serodiagnostik genutzt. Für die Heilbehandlung der Dictyokaulose können gegen adulte und juvenile Stadien wirksame Medikamente eingesetzt werden (z. B. Levamisol[®], (Pro) Benzimidazole, Netomin[®], Ivermectin[®]). Diese Präparate sind hochwirksam und können somit durch akute Lungenwurmerkrankungen bedingte Ausfälle meist verhindern (H. Mehlhorn, D. Düwel, W. Raether (1993) Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag, S. 223-227). Bei einer prophylaktischen/metaphylaktischen Behandlung lassen die Wirkstoffe aufgrund ihrer radikalen Wirksamkeit möglicherweise die Auseinandersetzung des Parasiten mit dem Immunsystem des Wirtes und somit die Ausbildung und Aufrechterhaltung einer belastbaren (Teil) Immunität nicht zu. Die Tiere sind dann einer Infektion im zweiten Weidejahr ungeschützt ausgesetzt (COBS, D. E., S. R. Pitt, J. Förster, M. T. Fox (1987) Res. Vet. Sci. 43: 273-275).

6
b) die gemäß a) hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und

c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus Dictyocaulus viviparus, cDNA-Klone isoliert werden, die mit den nach b) hergestellten Hybridisierungsproben unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung der genannten DNA, bei welchem

a) PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz hergestellt werden,

b) mit den so erzeugten PCR-Primern aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus Dictyocaulus viviparus, PCR-Fragmente generiert werden,

c) welche kloniert und nach gängigen Methoden analysiert werden und

d) zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch Hybridisierungsverfahren wie oben beschrieben an Stelle der degenerierten Oligonukleotide verwendet werden.

Das zuletzt beschriebene Verfahren kann auch so abgewandelt werden, daß für die PCR-Reaktion als Matrize RNA benutzt wird, die in einem zusätzlichen Schritt zunächst revers transkribiert und der so entstandene cDNA-Erststrang zur PCR verwendet wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1, welches vorzugsweise durch Expression einer wie oben beschrieben erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung nach dem Fachmann bekannten Methoden erhältlich ist.

5
1
7. Gln Phe Pro Ile Leu Thr Ser Val Phe Ser
14
Asn Glu Glu Lys
(SEQ ID NO.: 7)

5
Als biologische Eigenschaft ist die Entwicklungshemmung von Dictyocaulus viviparus im Rind nach Vakzination herausragend.

10
Die Erfindung hat daher zum Gegenstand ein immunogenes Protein mit protektiver Wirkung, welches aus adulten Würmern des Lungenwurms Dictyocaulus viviparus isoliert wird und welches bevorzugt ein Molekulargewicht von 15000-18000 Da, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5.3-5.9 und Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist.

15
Ein vorzugsweiser Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, welches ein Molekulargewicht von 16500 ± 1500 Da und / oder einen isoelektrischen Punkt von 5.6 hat.

20
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines Proteins bei dem die Isolierung mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird.

25
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA, kodierend für ein Protein wie oben beschrieben, vorzugsweise eine DNA, die eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Isolierung der genannten DNA, bei welchem

30
a) degenerierte Oligonukleotide, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon hergestellt werden,

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein immunchemisches Verfahren unter Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus*, mit welchem die Menge an DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern bestimmt wird, indem man mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinder Serum inkubiert und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörper-komplexe durch Peroxidase-konjugierte, polyklonale Antikörper und eine entsprechende, dem Fachmann bekannte Farbreaktion nachweist.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des oben beschriebenen Proteins von *D. viviparus* als Vakzine, verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen Dictyocaulose.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostik-Kit, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus*.

Schließlich ist ein Gegenstand der Erfindung eine Vakzine, enthaltend das oben beschriebene Protein von *D. viviparus* sowie einen Carrier, ein Adjuvans sowie ggf. Hilfsstoffe.

Die Erfindung wird nun anhand von Beispielen näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein. Die Tabelle ist wie folgt beschrieben:

Tabelle 1: Teilaminosäuresequenzen des isolierten DV 17-Proteins aus Dictyocaulus viviparus und die daraus ableitbare degenerierte Nukleotidsequenz. Abkürzungen:
N = A, G, C, T; Y = T, C, H = A, C, T; R = A, G; M = A, C

Für die Identifizierung von Protein DV 17 wurden Normalseren und Infektionsseren von Rindern verwendet, die mit gastrointestinalen Nematoden wie Ostertagia ostertagi und Cooperia oncophora sowie dem Lungenwurm Dictyocaulus viviparus infiziert waren.

Chromatographisch aufgetrennte Proteinfraktionen gewonnen aus homogenisierten, adulten Lungenwürmern wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidelektrophorese weiter aufgetrennt und auf Immobilion P-Membranen immobilisiert (Semidry-Blotting). Das lungenwurmspezifische Protein DV 17 wurde anschließend mit den

spezifischen Infektionsseren detektiert und mittels Umkehrphasen-HPLC-Säule weiter aufgereinigt. Die Reinheit der Proteinfraktion wurde in silber-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen (Phastgele) überprüft. Mittels BCA-Proteinassay wurde die Proteinkonzentration in elektrophoretisch reinen DV 17-Fractionen bestimmt und bei -85°C tiefgefroren. Helminthennaive Rinder wurden 2 mal mit jeweils einer definierten Menge von gereinigtem DV 17 vakziniert. Die Rinder wurden 1 Woche nach der zweiten Vakzination mit L3-Larven von Dictyocaulus viviparus belastet (Challenge). Nicht vakzinierte Tiere dienten als Kontrolle. 4 Wochen nach dem Challenge wurden die Rinder geschlachtet, in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt und die Länge der männlichen und weiblichen Würmer gemessen. Als Maß für den Immunschutz wurde die Reduktion der Anzahl adulter Würmer im Vergleich zur nicht vakzinierten Kontrolle definiert.

„Stringente Bedingungen“ in Zusammenhang mit DNA-Hybridisierung bedeutet in der vorliegenden Anmeldung 6xSSC, 68°C.

Die PCR-Bedingungen sind nach jedem Fachmann bekannten Methoden in Vorversuchen zu bestimmen.

Beispiel 1: Herstellung von Infektionsseren

Helminthennaive Rinder im Alter von 6 Monaten wurden mit unterschiedlichen Dosen von dritten Larven verschiedener Nematodenspezies (Dictyocaulus viviparus, Ostertagia ostertagi, Cooperia oncophora) infiziert. Die Infektions-dosen betrugen in der Dictyocaulus-Gruppe 2500, 1250 und 500 Larven / Rind; je Dosis wurden 3 Tiere verwendet. Für die Ostertagia-Gruppe wurden Infektionsdosen von 70 000, 30 000 und 15 000 Larven / Rind gewählt. Neben einer nicht infizierten Gruppe (= Negativkontrolle) wurde zusätzlich eine gemischte Gruppe mitgeführt, in

9
der jedes Rind mit 2 500 Dictyocaulus Larven, 10 000 Ostertagia Larven und 10 000 Cooperia Larven infiziert wurde. An den Tagen D0 (= Tag der Infektion), D +21, D +40, D +56, D +70, D +84, D +98 und D +112 wurden von jedem Rind Serumproben gewonnen, die aliquotiert bei -25°C aufbewahrt wurden. Die Seren wurden zur Identifizierung des Dictyocaulusantigens DV 17 in elektrophoretisch, chromatographisch aufgetrennten Proteinfraktionen sowie zur Beurteilung der Spezifität verwendet.

10 Beispiel 2: Gewinnung adulter Lungenwürmer

15 6 Monate alte, helminthennaive Rinder wurden mit jeweils 5000 dritten Larven von Dictyocaulus viviparus oral infiziert; am darauffolgenden Tag erhielten die Tiere die gleiche Infektionsdosis. 28 Tage nach der Infektion wurden die Rinder geschlachtet und nach der Sektion adulte Würmer aus den Lungen gesammelt. Die Würmer wurden anschließend 3x mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, gewogen und bei -85°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

20 Beispiel 3: Extraktion von DV 17 aus adulten Lungenwürmern

25 10 g gefrorene Wurmmasse wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 40 ml 0.025 M Tris-HCl-Lösung pH 7.4 + 2 mM Pefabloc® im Gewebehomogenisator homogenisiert. Zur Entfernung grober Gewebebestandteile wurde das Homogenat bei 3010 g und 4°C 15 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde bei 4°C für 20 min bei 39 800 g zentrifugiert und der Überstand unter den gleichen Bedingungen 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach Filtration mit 1.2 µm-Filtern in 1 Liter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) über Nacht bei 4°C dialysiert (cut off der Dialysemembran 8000).

30

Beispiel 4: Präparative Gelfiltration

10
Der dialysierte Überstand wurde bei 39 800 g 15 min zentrifugiert und der klare Überstand im Pharmacia-FPLC-System mittels präparativer Gelfiltrationssäule (Säulentyp XK 16 / 60; Trennmedium: Superdex 75 prep grade, Säulenvolumen: 124 ml) aufgetrennt. Zur Elution wurde PBS pH 7.4 verwendet. Die Fraktionen mit den Retentionsvolumina 65 - 75 ml wurden gesammelt und mit Ultra-filtrationsmodulen (cut off 3000) aufkonzentriert. Mit einem amplifizierten Western Blot wurde Protein DV 17 nachgewiesen.

30

Beispiel 5: Western Blot-Analyse

15 Die aufkonzentrierte Superdex 75 prep grade-Fraktion wurde im Verhältnis 1:2 mit reduziertem SDS-Puffer gemischt; davon wurden jeweils 40 µl / Probenvertiefung auf ein SDS-Exzelgel (Fa. Pharmacia) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Multiphor II-Kammer (Fa. Pharmacia) unter standardisierten Laufbedingungen (600 V, 50 mA, 30 W, Laufzeit: 90 min) durchgeführt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semidry-Blotting“ (Tovey ER, Baldo BA. Electrophoresis. 8, 1987, 384-387) auf Immobilon P-Membranen transferiert (Transferbedingungen: 45 min, konstante Stromstärke 0.8 mA / cm²) und nach einer 24 stündigen Blockphase mit 3 %igem Rinderserumalbumin in Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit einem Dictyocaulus-spezifischem Immenserum (gewonnen am D +40, siehe Beispiel 1) in einer Verdünnung von 1:20 1 Stunde inkubiert. Als Negativkontrolle wurde 25 Rindernormalserum (Verdünnung 1:20 verwendet). Nach 3 maligem Waschen mit TBS + 0.05 % Tween 20 wurde die Blotfolie mit einem Biotin-markierten Ziege anti Rind IgG (H+L) Antikörper (1:500; Fa. Pierce) für 1 Stunde inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (TBS + 0.05 % Tween 20) erfolgte eine 1 stündige Inkubation mit dem Enzymkonjugat Biotin-Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:2500; Fa. Pierce). Die Substratentwicklung wurde mit dem Substratkit der Fa. Biorad durchgeführt.

30

1	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	Pro	10
5	Glu	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Ile	Pro	Gln	Asn	20
5	Val	Ala	Glu	His	Leu	Lys				(SEQ ID NO.: 5)	25
1	Phe	His	Ala	Glu	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	10
6	Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys		(SEQ ID NO.: 6)	15
1	Gln	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Phe	Ser	10
15	Asn	Glu	Glu	Lys						(SEQ ID NO.: 7)	14

Beispiel 10: Nachweis eines protektiven Effekts von DV 17

5 Monate alte, helminthennaive Bullenkälber (Stallaufzucht, koproskopischer Nachweis negativ) wurden mit jeweils 50 µg gereinigtem, nativem DV 17 subcutan vakzinert. 4 Wochen später erfolgte eine Boostervakzination mit 45 µg Antigen / Rind. Die Tiere wurden 1 Woche nach der 2. Vakzination mit jeweils 2 x 1000 L3-Larven von Dictyocaulus viviparus belastet (= Challenge). Nicht vakzinerte Tiere dienten als Kontrolle. 35 Tage nach dem Challenge wurden die Tiere geschlachtet und in der Lunge die Anzahl adulter Würmer bestimmt; gleichzeitig wurde die Länge intakter männlicher und weiblicher Würmer gemessen. In der vakzinerten Gruppe wurde eine um 80 % reduzierte Anzahl adulter Würmer gefunden. Adulte Würmer aus der vakzinerten Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner (Reduktion 33 %).

Beispiel 11: ELISA zum serologischen Nachweis einer Dictyocaulose

ELISA-Platten (Maxisorb der Fa. Nunc) wurden mit einer Konzentration von 5 µg DV 17 / ml PBS beschichtet; das Reaktionsvolumen betrug 100 µl pro Vertiefung. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C wurden die Platten 3 mal im ELISA washer gewaschen, das Waschvolumen pro Vertiefung betrug 200 µl. Als Waschlösung wurde Reinstwasser +0.1 % Tween 20 verwendet. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation (3 Stunden bei Raumtemperatur) mit einem proteolytischen Gemisch von Gelatine (Fa. Boehringer Mannheim) blockiert. Die Inkubation erfolgte auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei einer Schüttelfrequenz von 300 rpm. Nach 3-maligem Waschen wurden die Vertiefungen mit einer 1:200-Verdünnung spezifischer Infektions- und Kontrollseren beschickt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nachweisantikörper wurde nach 3-maligem Waschen Peroxidase-konjugierte, polyklonale Kaninchenantikörper gegen bovines IgG (Fc-Fragment spezifisch; Fa. Dianova) in einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet; die Inkubation dauerte 30 min. Die Platten wurden anschließend 4 mal gewaschen und dann mit Substratlösung inkubiert (Zusammensetzung: 5 ml 10-fach konzentrierter ABTS-Puffer + 45 ml Reinstwasser + 1 Tablette ABTS (≈ 50 mg ABTS). Die Substratentwicklung erfolgte bei Raumtemperatur und wurde im ELISA-Reader alle 10 min bei 414 nm überwacht. Dictyocaulus-spezifische Antikörper waren im ELISA frühestens 28 Tage nach einer Lungenwurminfektion nachweisbar.

Tabelle 1

1	Ser	Glu	Ser	Leu	Tyr	Glu	Lys	(SEQ ID NO.: 1)
25	TCN	GAR	UCN	YTN	TAY	GAR	AAR	(SEQ ID NO.: 8)
30	1	Met	Met	Asp	Asn	Phe	Val	Lys
	ATG	ATG	GAY	AAY	TTY	GTN	AAR	(SEQ ID NO.: 9)

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

5	1	15					16					(SEQ ID NO.: 6) (SEQ ID NO.: 13)	
		Pro	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys				
		CCN	TCN	YTN	GAR	GAR	YTN	AAR	AAR				
7.	5	1	Gln	Phe	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Val	Phe	Ser	10
			CAR	TTY	CCN	ATH	YTN	ACN	TCN	GTN	TTY	TCN	
10	14	1	Asn	Glu	Glu	Lys							(SEQ ID NO.: 7) (SEQ ID NO.: 14)
			AAY	GAR	GAR	AAR							

Patentansprüche:

1. Immunogenes Protein DV 17 mit protektiver Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein aus adulten Würmern des Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* isoliert wird. 5
2. Protein, gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von 15 000 - 18 000 dalton, einen isoelektrischen Punkt zwischen 5.3 und 5.9 und Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1 aufweist. 10
3. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein ein Molekulargewicht von $16\,500 \pm 1\,500$ dalton hat. 15
4. Protein, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte Protein einen isoelektrischen Punkt von 5.6 hat. 20
5. Verfahren zur Isolierung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung mit Hilfe von Extraktionsmethoden und chromatographischen Methoden durchgeführt wird. 25
6. DNA, kodierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4. 30
7. DNA, gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 enthält.
8. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) degenerierte Oligonukleotide, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon hergestellt werden,

- b) die hergestellten Oligonukleotide radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden und
- c) aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dictyocaulus viviparus*, cDNA-Klone isoliert, die mit den nach b) hergestellten Hybridisierungsproben unter stringenten Bedingungen hybridisieren. 5
9. Verfahren zur Isolierung einer DNA gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) PCR-Primer, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 oder Teile davon oder enthaltend eine Oligo-dT-Sequenz, hergestellt werden,
 - b) mit den so erzeugten PCR-Primern aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus *Dictyocaulus viviparus*, PCR-Fragmente generiert werden, 10
 - c) welche kloniert und nach gängigen Methoden analysiert werden und
 - d) zur Vervollständigung der cDNA-Sequenz durch Hybridisierungsverfahren gemäß Anspruch 8 an Stelle der degenerierten Oligonukleotide verwendet werden. 15
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß für die PCR-Reaktion als Matrize RNA benutzt wird, die in einem zusätzlichen Schritt zunächst revers transkribiert und der so entstandene Erststrang zur PCR verwendet wird. 20
11. Rekombinantes Protein, enthaltend Aminosäureteilsequenzen gemäß Tabelle 1. 25
12. Rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression einer nach einem der Ansprüche 8 bis 10 erhaltenen cDNA in Prokaryonten oder Eukaryonten und Aufreinigung. 30

13. Immunchemisches Verfahren zur Bestimmung der Menge von DV 17 spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern unter Verwendung eines Proteins, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß mit DV 17 beschichtete ELISA-Platten mit zu untersuchendem Rinderserum inkubiert werden und gegebenenfalls gebildete DV 17 / Antikörperkomplexe mit Peroxidase-konjugierten, polyklonalen Antikörpern und einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

14. Verwendung eines Proteins, gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, 11 oder 12 als Vakzine verbunden mit einem Carrier oder Adjuvans und ggf. Hilfsstoffen zur Immunisierung von Rindern gegen Dictyokaulose.

15. Diagnostik-Kit enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12.

16. Vakzine, enthaltend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 - 4, 11 oder 12 sowie einen Carrier, ein Adjuvans sowie ggf. Hilfsstoffe.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hoechst Aktiengesellschaft
(B) STRASSE: -
(C) ORT: Frankfurt
(D) BUNDESLAND: -
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 65926
(G) TELEFON: 069-305-3005
(H) TELEFAX: 069-35-7175
(I) TELEX: 41234700 ho d

- (ii) ANMELDETITEL: Dictyocaulus viviparus Antigen zur Diagnose des Lungenwurmbefalles und zur Vakzinierung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Ser Glu Ser Leu Tyr Glu Lys
1 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
(B) LAGE: 1..7

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Met Asp Asn Phe Val Lys
1 5

2

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

10

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..14

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:
 Tyr Lys Asp Glu Asn Glu Phe Met Asp Ala Leu Lys Gln Lys
 1 10

20

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..20

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
 Tyr Asp Ile Pro Glu Gln Tyr Arg Glu Ile Ile Pro Gln Asn Val Ala
 1 5 10 15

40

Glu His Leu Lys
 20

45

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..26

60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
 Asp Ala Ile Glu Lys Tyr Glu Asp Ile Pro Glu Gln Tyr Arg Glu Ile
 1 5 10 15

65

3

Ile Pro Gln Asn Val Ala Glu His Leu Lys
 20 25

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

15

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..18

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
 Phe His Ala Glu Leu Leu Ala Gly Ile Lys Pro Ser Leu Glu Leu
 1 5 10 15

25

Lys Lys

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
 (B) LAGE: 1..14

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:
 Gln Phe Pro Ile Leu Thr Ser Val Phe Ser Asn Glu Glu Lys
 1 5 10

50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:
 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

60

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 1..21

65

5	TCNGARUCNY TINTAYCARAA R	21	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:	5	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:
10	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 21 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear			10	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 78 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear
15	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)			15	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
20	(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..21			20	(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..78
25	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:	21	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:	25	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
30	ATGATGGAYA AYTTCGTNAA R			30	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 54 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear
35	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:			35	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
40	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 42 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear			40	(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..54
45	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)			45	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
50	(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..42			50	TTTCAYGCNG ARYTNTYNGC NGCNATHAAR CNTCTNYTNG ARGARYTNAAR
55	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:	42	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:	55	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:
60	TATYAARGAYG ARAAYGARTT YATGGAYGCN YTNAARCARA AR			60	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 42 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear
65	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:			65	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
	(1) SEQUENZCHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 60 Basenpaare (B) ART: Nukleinsäure (C) STRANGFORM: Einzel (D) TOPOLOGIE: linear				(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..42
	(11) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)				(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:
	(1x) MERKMALE: (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon (B) LAGE: 1..60	60	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:		CARTTYCCNA THYTNACNTC NGTNTYTTCN AAYGARGARA AR
	(1x) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:				

THIS PAGE BLANK (USPTO)